

# Análise do Perfil Protéico e da Atividade Hemaglutinante no Extrato Total de Sementes de *Peltogyne venosa*

Adriana Bariani<sup>1</sup>, Silvana Cristina Pando<sup>2</sup>, José Francisco de Carvalho Gonçalves<sup>3</sup>, Larissa Ramos Chevreuil<sup>4</sup>, Adamir da Rocha Nina Junior<sup>4</sup>, Luiz Augusto Gomes de Souza<sup>5</sup>

## Introdução

A diversidade vegetal da Amazônia abrange tanto espécies com comprovada aplicabilidade quanto inúmeras outras espécies com potencial para agregar valor a diferentes cadeias produtivas, a partir de seus frutos, sementes, óleos e/ou resinas. No entanto, é importante ressaltar que outros produtos da flora amazônica ainda não são ou são minimamente explorados: biomoléculas como, lipídios, carboidratos e proteínas com elevado potencial de aplicação bioindustrial podem ser a alternativa mais adequada para o verdadeiro equilíbrio entre o uso e a preservação do ambiente florestal [1].

Dentre essas biomoléculas, destacam-se as proteínas, que além das mais variadas funções biológicas, podem atuar tanto em diferentes mecanismos de defesa das plantas quanto nos sinais de respostas às mudanças dos fatores bióticos e/ou abióticos. Entre as classes protéicas, as lectinas exibem elevado potencial biotecnológico, pois são proteínas de defesa de ocorrência natural em diferentes espécies vegetais, com grande acúmulo em sementes de leguminosas, apresentando como característica marcante a interação específica com diferentes carboidratos nas superfícies celulares, promovendo a hemaglutinação [2, 3, 4].

Deste modo, o isolamento de lectinas poderá contribuir com os avanços obtidos até então na prospecção de moléculas e/ou princípios ativos, no sentido de agregar valor aos produtos da flora amazônica. Assim, o objetivo deste estudo foi detectar a possibilidade de ocorrência de lectinas em sementes de *Peltogyne venosa* (M. Vahl) Benth (Leguminosae: Caesalpinioideae).

## Material e métodos

### A. Local de realização das atividades

As atividades foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal e Laboratório de

Proteômica de Plantas, localizados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) - Manaus/AM.

### B. Material biológico

As sementes de *P. venosa* (pau-roxo) foram coletadas em uma única matriz presente no Arquipélago de Anavilhanas/AM, localizado entre os municípios de Manaus e Novo Airão (2°00' -3°02' S e 60°27' -61°07' W) [5].

Para a detecção da presença de proteínas hemaglutinantes, amostras de sangue foram obtidas de duas espécies de animais saudáveis (camundongo e hamster), provenientes do Biotério do INPA.

### C. Preparo do extrato total

Sementes maduras (30g) foram trituradas até a obtenção de um material finamente pulverizado. Este material foi homogeneizado em NaCl (0,15 M) e centrifugado a 5000 x g durante 20 minutos a 4° C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante dialisado e utilizado nas etapas posteriores.

### D. Quantificação de proteínas

A concentração relativa de proteínas totais do extrato foi estimada de acordo com o método descrito por Bradford [6], usando BSA como padrão.

### E. Eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE)

A análise do perfil protéico foi realizada segundo o método descrito por Laemmli [7].

### F. Coleta e preparo das hemácias

As amostras de sangue foram coletadas assepticamente e homogeneizadas em igual volume de solução de Alsever (Glicose 2,05%, Citrato de Sódio 0,8 % e NaCl 0,42%). As hemácias foram lavadas em NaCl (0,15 M) por quatro vezes (1000 x g, 4°C, 20 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado (polpa de hemácias) foi utilizado para preparar a solução de hemácias a 2%.

### G. Detecção de atividade hemaglutinante no extrato

1. Bolsista GM/CNPq. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Laboratório de Fisiologia e Bioquímica vegetal/Campus V8, Av. Efigênio Salles, s/n, V8, Manaus, AM, CEP 69060-020. E-mail: a\_bariani@yahoo.com.br

2. Professora do Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Laboratório de Bioquímica, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3.000, Coroado, Setor Sul, ICB, DCF, CEP 69.077-000. E-mail: scpando@ufam.edu.br

3. Pesquisador Adjunto, Coordenação de Silvicultura Tropical, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal - Campus V8, Av. Efigênio Salles, s/n, V8, Manaus, AM, CEP 69060-020. E-mail: jfc@inpa.gov.br

4. Bolsista PIBIC/INPA. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Laboratório de Fisiologia e Bioquímica vegetal/Campus V8, Av. Efigênio Salles, s/n, V8, Manaus, AM, CEP 69060-020. Email: larissachevreuil@gmail.com; adamirjr@gmail.com

5. Pesquisador Titular, Coordenação de Pesquisa em Agronomia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Campus V8, Av. Efigênio Salles, s/n, V8, Manaus, AM, CEP 69060-020. E-mail: souzalag@inpa.gov.br

Apoio financeiro: FAPPEAM/PPI.

### total

A atividade hemaglutinante do extrato total foi avaliada em placas de microtitulação de 96 poços, contendo 8 fileiras de 12 poços, os quais foram preenchidos com 50 µL de NaCl (0,15 M) e em seguida acrescidos 50 µL de extrato total. A partir do sétimo poço foi realizada diluição serial. Por último adicionou-se 50 µL de solução de hemácias 2% em todos os poços. O controle negativo continha apenas a solução NaCl (0,15 M) e 15 µL de solução de hemácias. Após doze horas de incubação a 10°C, a atividade hemaglutinante do extrato total foi analisada visualmente. As hemácias mais susceptíveis a hemaglutinação serão utilizadas em ensaios posteriores para detecção da presença de lectinas nas frações protéicas.

## Resultados e Discussão

De acordo com os dados de dosagem de proteínas estimou-se que para cada mL de extrato total de *P. venosa* foi detectada a presença de 162 µg de proteínas totais.

O perfil protéico (Figura 1a) do extrato total revelou maior intensidade de coloração de proteínas com massa molecular aparente de 10-15 kDa e 40-50 kDa.

Adicionalmente, apesar de a massa molecular da maioria das subunidades protéicas de lectinas de leguminosas estar em torno de 30 kDa [8], algumas podem apresentar baixa massa molecular, como por exemplo a lectina isolada de sementes de *Delonix regia* (DRL: 12 kDa) [9]. Neste caso, é provável que *P. venosa* apresente lectinas em suas sementes. Contudo ensaios de purificação do extrato total e caracterização físico-química das frações protéicas ainda serão realizados para confirmar a presença de lectinas.

O extrato total ocasionou hemaglutinação nas hemácias testadas, na concentração mínima de 8,1 µg de proteína total, sugerindo que proteínas da classe das lectinas podem estar presentes em sementes de *P. venosa* (figura 1b).

Diante dos resultados apresentados, pode-se considerar que as sementes de *P. venosa* podem conter proteínas da classe das lectinas, visto que ocorreu atividade hemaglutinante contra as hemácias testadas.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro. Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (INPA-CPST-LFBV).

## Referências

- [1] GONÇALVES, J.F. de C.; FERNANDES, A.V.; OLIVEIRA, A.F.M.; RODRIGUES, L.F.; MARENCO, R.A. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilia Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 139-142.
- [2] MANCINI FILHO, J.; LAJOLO, F.M.; VIZEU, D.M. 1979. Lectins from red kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activities. *Journal of Food Science*, 44 (4): 1194-1196.
- [3] RICHARDSON, M. 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*, 5: 259-305.
- [4] BUENO, F.; LUCCA, L.L.; COLLAZIOL, D.; FARIAS, F.M.; VOZ'ARI-HAMPE, M.M. 2004. Propriedades biológicas da lectina de *Mikania laevigata*. XVI Salão de Iniciação Científica: sessões temáticas – Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1:338.
- [5] SOUZA, L.A.G.; SILVA, M.F. 2002. Levantamento das leguminosas do arquipélago das Anavilhanas, baixo rio Negro, Amazonas. *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica*, 18: 3-35.
- [6] BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- [7] LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227: 680-685.
- [8] RUDIGER, H. 1998. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.*, 161: 130-152.
- [9] PANDO, S.C.; MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; TOYAMA, M.H.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. 2002. Biochemical characterization of a lectin from *Delonix regia* seeds. *Journal of Protein Chemistry*, 21 (4):279-285.

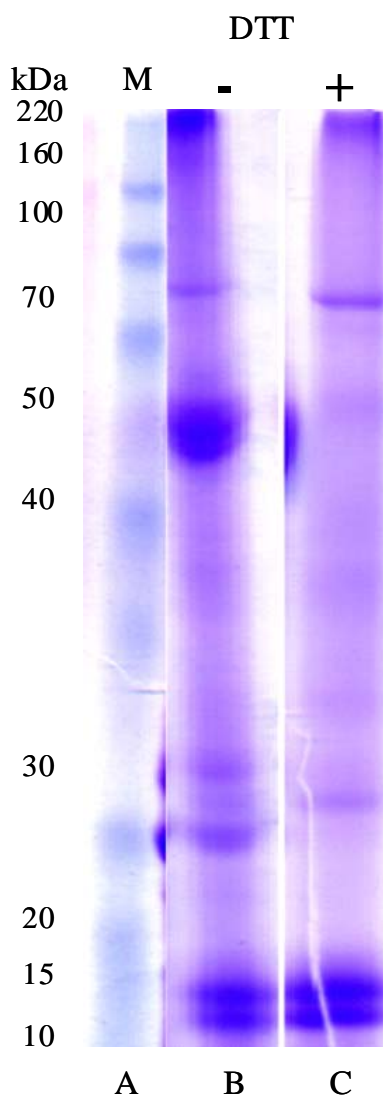


Fig. a

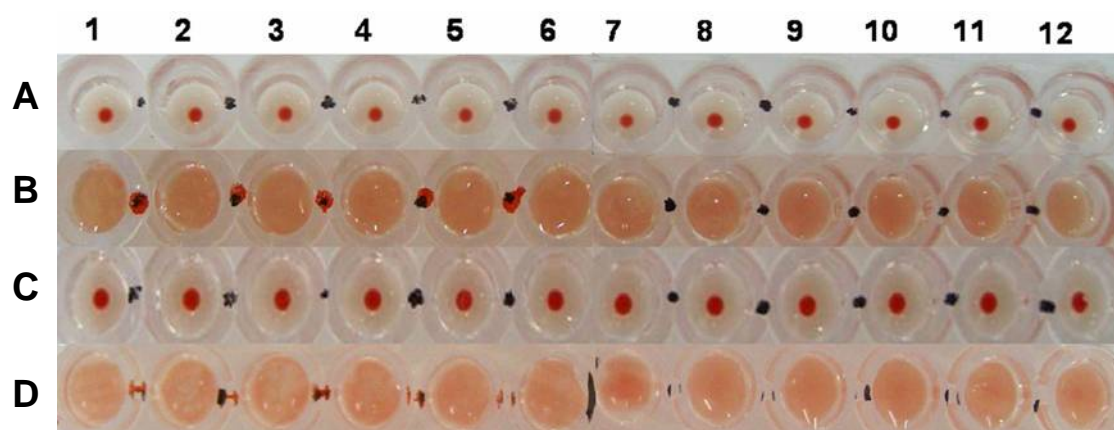


Fig. b

**Figura 1 - a)** Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5%. **A:** marcador de massa molecular: Bench Mark Protein Ladder (220kDa – 10kDa). **B e C:** 20µg de extrato bruto de sementes de *P. venosa* em condições não redutoras (- DTT) e redutoras: (+ DTT). kDa: kiloDalton. As bandas de proteínas foram coradas com Coomassie brilliant blue R-250. **b)** Detecção da atividade hemaglutinante em extrato bruto de sementes de *Peltogyne venosa* sobre hemácias de diferentes animais. Legenda: **A** – controle: hemácias de camundongo (sem extrato), **B** – ensaio: hemácias de camundongo (com extrato), **C** – controle: hemácias de hamster (sem extrato) e **D** – ensaio: hemácias de hamster com extrato); 1 – 6: sem diluição serial e 7 – 12: com diluição serial.